



Wybrane aspekty transformacji genetycznej ogórka, pomidora i papryki

Grzegorz Bartoszewski, Maria Szwacka, Magdalena Czarny, Katarzyna Niemirowicz-Szczytt, Stefan Malepszy

Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin,
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Selected aspects of genetic transformation in cucumber, tomato, and sweet pepper

Summary

Plant transformation is a technology widely used in gene functional analysis and crop improvement. In this article we have attempted to sum up the studies on plant transformation carried out by the Department of Plant Genetics, Breeding and Biotechnology, Warsaw University of Life Sciences, pointing out to recent developments in this field. Efficient *Agrobacterium*-based transformation protocols for cucumber and tomato were established and applied. Several traits, including fruit taste (thaumatin gene), chilling tolerance (pGT::DHN24), parthenocarp (DefH9::iaaM), and virus resistance (TSWV nucleoprotein gene), were modified. Transgenic cucumber lines expressing mitochondrially targeted GFP protein were developed. Sensory evaluation of fruit traits and of unintended effects of cucumber expressing thaumatin gene was made. Cucumber and tomato transformation was also applied with the aim to carry out gene functional analysis. Having introduced overexpression, silencing, and promoter gene constructs, we were able to obtain several transgenic tomato lines. Attempts have been made to set up an efficient method of sweet pepper transformation.

Key words:

Cucumis sativus L., *Solanum lycopersicum* L., *Capsicum annuum* L., agrotransformation, transgenic plants.

Adres do korespondencji

Grzegorz Bartoszewski,
Katedra Genetyki Hodowli
i Biotechnologii Roślin,
Wydział Ogrodnictwa
i Architektury Krajobrazu,
Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego,
ul. Nowoursynowska 159,
02-776 Warszawa.

1. Wprowadzenie

Znaczenie gospodarcze ogórka jest duże, zarówno w warunkach Polski jak też w wielu innych krajach świata. Oczekuje się, że biotechnologia przyczyni się do postępu w uprawie ogórka i jego wykorzystaniu (1). Szczególnie duże oczekiwania dotyczą hodowli nowych odmian i nasiennictwa. Podobnie jest z innymi warzywami. Prace nad transformacją ogórka i pomidora w Polsce trwają od 1996 r. i są prowadzone wyłącznie w naszej katedrze. Na początku 2000 r. rozpoczęliśmy także prace z papryką. W tym artykule przedstawiamy głównie informacje wskazujące na postęp jaki zanotowaliśmy w tym zakresie w naszej jednostce w stosunku do danych sprzed 4 lat.

2. Haploidy i podwojone haploidy (DH)

Rośliny haploidalne mogą stanowić ważny element w strategii uzyskiwania roślin genetycznie zmodyfikowanych. Jest kilka warunków, które należy spełnić aby zamierzenie takie było realne. Podstawowym jest skuteczność uzyskiwania haploidów i metoda regeneracji zapewniająca wysoki udział diploidów. U ogórka otrzymujemy haploidy w wyniku procesu haploidalnej partenogenezy indukowanej zapyleniem napromieniowanym pyłkiem. Metoda została wdrożona w trzech firmach hodowlano-nasiennych będących spółkami skarbu państwa (2). Metoda jest doskonała pod kątem uzyskiwania takiej liczby haploidów, która byłaby reprezentatywną próbą segregujących gamet, a także pod względem diagnostyki molekularnej (3). Rozpoczęto też prace nad alternatywną metodą otrzymywania haploidów za pomocą kultury pylników lub uwolnionych mikrospor. Pierwsze wyniki wskazują na możliwość uzyskania kalusa i regeneracji roślin w kulturze pylników.

Rośliny haploidalne ogórka można zaliczyć do stabilnych monoploidów ($n = 7$) i w trakcie ich rozwoju nie zaobserwowano spontanicznej diploidyacji (4). Konieczne jest zatem stosowanie zabiegu podwajania liczby genomów. Skuteczne okazały się dwie metody: 1) bezpośrednia regeneracja z mikroskrawków juwenilnych liści oraz 2) traktowanie kolchicyną stożków wzrostu roślin haploidalnych *in vitro* (5,6).

3. Wartość sensoryczna i efekty niezamierzone linii transgenicznych ogórka z ekspresją genu taumatyny

Wykorzystując gen kodujący słodkie białko taumatynę do transformacji ogórka (*Cucumis sativus* L.) zamierzaliśmy sprawdzić możliwość jego ekspresji i uzyskania słodkiego smaku w roślinach dyniowatych. Linie transgeniczne ogórka z ekspresją tego genu zostały uzyskane metodą agrotransformacji (7). Niektóre z linii transgenicznych zawierały nowe właściwości nie wynikające ze składu konstrukcji, tak zwa-

ne efekty niezamierzone (ang. *unintended effect*). Ich zakres oraz nasilenie były zróżnicowane.

3.1. Wartość sensoryczna owoców

Ocena sensoryczna i analiza składu aromatów dotyczyła owoców kilku linii transgenicznych pochodzących z kilku pokoleń generatywnych. Ocenę sensoryczną przeprowadziły trzy różne zespoły badawcze (7-9). Niezależnie od zastosowanej metody analitycznej, najwyższą intensywność słodkiego smaku stwierdzano na ogół w linii transgenicznej o wysokim stężeniu taumatyny. W niektórych liniach stwierdzono także podwyższoną intensywność zapachu świeżego owocu, bądź też wyczuwany był zapach nie typowy dla ogórka (10). W przeprowadzonej analizie ilościowej i jakościowej zapachowych związków lotnych wykazano występowanie różnic, włącznie ilościowych pomiędzy kontrolą i próbami transgenicznymi (9).

Za kształtowanie aromatu ogórka odpowiedzialnych jest około 30 związków lotnych, z których najważniejszymi są (E,Z)-2,6-nonadienal i (E)-2-nonenal (11). Dominującym ilościowo związkiem lotnym we wszystkich badanych liniach, włączając kontrolę, okazał się (E,Z)-2,6-nonadienal, związek któremu przypisuje się główną rolę w kształtowaniu aromatu ogórka. Jego stężenia w owocach linii transgenicznych były kilkakrotnie wyższe niż w kontroli. Spowodowało to intensywniejszy zapach owoców linii transgenicznych i może tłumaczyć niską ocenę sensoryczną kontroli (9).

3.2. Efekty niezamierzone

Efekty niezamierzone mogą być spowodowane wieloma czynnikami (12). Zmiany niezamierzone, które wystąpiły w badanych liniach ogórka nie miały jednak wpływu zasadniczego na wartość żywieniową oraz na właściwości w uprawie polowej. Zmiany te dotyczyły: 1) zwiększonej tolerancji na mączniak rzekomy, chorobę wywoływaną przez *Pseudoperonospora cubensis* (7), 2) struktury i ultrastruktury liścia (13) oraz 3) składu chemicznego owoców i liści (14,15, Szwacka, dane nie publikowane). W dalszych badaniach wykazano, że warstwy wosków epikutylarnych i ściany komórek epidermalnych w liściach linii transgenicznych są grubsze niż w kontroli (13). Ponadto woski linii transgenicznych wyróżniały się inkrustacją, a ściany komórek epidermalnych, podobnie jak mezofilowych, zwartą strukturą (13). Wymienione cechy liści, jak się wydaje, mogą przynajmniej częściowo tłumaczyć zwiększoną tolerancję na infekcje.

Jednym z elementów oceny efektów danej modyfikacji genetycznej jest wpływ roślin zmodyfikowanych na środowisko, w tym na organizmy nie docelowe. Przeprowadzone badania dotyczyły występowania szkodników i fauny pożytecznej na transgenicznych ogórkach z ekspresją genu taumatyny. Wykazano, że fitofagi (np. zmiennik lucernowiec, wciornastek tytoniowiec) zasiedlały mniej licznie rośliny

transgeniczne niż kontrolne, natomiast zagęszczenie przedstawicieli fauny pożytecznej było podobne (16).

4. Wykorzystanie białka dehydrynowego DHN24 do uzyskania ogórka i pomidora tolerancyjnego na niskie temperatury

Stresy abiotyczne, do których zalicza się stresy spowodowane suszą, zasoleniem, wysoką oraz niską temperaturą są jedną z głównych przyczyn strat plonów w produkcji rolniczej. Stres spowodowany temperaturą poniżej 14°C jest szczególnie istotny w przypadku gatunków ciepłolubnych, do których zalicza się m.in. ogórek i pomidor. W ostatnich latach wyizolowano i scharakteryzowano wiele genów związanych z reakcją roślin na chłód (17). Do oryginalnych polskich osiągnięć należy wyizolowanie przez zespół prof. T. Rorata genów kodujących białka związane z aklimatyzacją roślin *Solanum sogarandinum* Ochoa do niskich temperatur (18,19). W ramach współpracy KGHIBR i IGR PAN podjęliśmy próbę wykorzystania genu kodującego białko dehydrynowe DHN24 do uzyskania roślin ogórka oraz pomidora tolerancyjnych na niskie temperatury.

W naszych badaniach wykorzystaliśmy konstrukcję genową pGT::Dhn24 (20). Konstrukcja ta składała się z promotora transferazy glukozywej aktywowanego czynnikami stresowymi (21) oraz sekwencji kodującej białko dehydrynowe o masie 24kDa (22). We wstępnych pracach wykonano transformację linii B ogórka konstrukcją pGT::Dhn24 i uzyskano transgeniczne rośliny pochodzące z 5 niezależnych zdarzeń transformacyjnych. Na podstawie oceny tolerancji na niskie temperatury roślin T₁ wykonanej w warunkach *in vitro* wykazano, że rośliny te mogą być tolerancyjne na niskie temperatury (20). W kolejnym doświadczeniu uzyskano rośliny z 47 niezależnych zdarzeń transformacyjnych i wydajność transformacji 1,6%. W kolejnych etapach pracy wybrano 12 homozygotycznych linii (pokolenie T₃) posiadających 1 miejsce integracji transgeny. Wykonywana jest obecnie ocena tolerancji tych linii na niskie temperatury (Bartoszewski i wsp., dane nie publikowane).

Konstrukcja pGT::Dhn24 została także wprowadzona do bardzo wczesnej polskiej odmiany gruntowej pomidora 'Beta 11'. Uzyskano transgeniczne rośliny z pięciu niezależnych zdarzeń transformacyjnych. Z roślin tych otrzymano trzy linie z pojedynczym miejscem integracji transgeny. Ekspresję transgeny potwierdzono metodą RT-PCR (23). Prace te są kontynuowane.

5. Linie transgeniczne ogórka z białkiem GFP lokującym się w mitochondriach

Ogórek jest unikatowym gatunkiem ze względu na specyficzną biologię mitochondriów. Genom mitochondrialny ogórka jest jednym z największych znanych genomów mitochondrialnych (24), jest dziedziczony ojcowsko (25), a w kulturach

tkankowych indukowane są kompleksowe rearanżacje w mtDNA (26,27). W naszej katedrze uzyskano serię mutantów mitochondrialnych ogórka nazwanych MSC, jednakże podłoże genetyczne tych mutacji nie jest do końca wyjaśnione (28,29). W celu lepszego zrozumienia mechanizmów związanych z dziedziczeniem i funkcjonowaniem genomu mitochondrialnego ogórka uzyskaliśmy linie transgeniczne z białkiem GFP lokującym się w mitochondriach.

Do transformacji wykorzystano konstrukcję genową udostępnioną przez prof. M. Hanson (Cornell Univ., USA), składającą się z genu kodującego białko GFP lokujące się w mitochondriach (coxIV-S65TmGFP4) oraz sekwencji regulatorowej składającej się z podwójnego promotora 35SCaMV i enhancera AMV (30). Łącznie uzyskano rośliny pochodzące z 10 niezależnych zdarzeń transformacyjnych. Na podstawie mikroskopii konfokalnej oraz analiz molekularnych potwierdzono, że białko GFP ulegało ekspresji i lokowało się w mitochondriach (31). Wybrane rośliny krzyżowano z mutantem mitochondrialnym MSC16, co pozwoliło uzyskać linie MSC16 z białkiem GFP lokującym się w mitochondriach. Otrzymane linie B-mtGFP i MSC16-mtGFP stanowią unikatowy materiał badawczy i mogą stać się liniami modelowymi w biotechnologii organellarnej ogórka.

6. Cecha partenokarpji w ogórku

Partenokarpia u ogórka nie jest nową cechą użytkową, ale jej uzyskanie na drodze modyfikacji genetycznej mogłoby przynieść kilka ważnych korzyści. Dlatego podjęliśmy próbę uzyskania takich roślin wprowadzając konstrukcję DefH9::iaaM (32). Wynikiem tych prac było uzyskanie 9 niezależnych linii transgenicznych, z których 5 było tetraploidami, a 4 diploidami. Linie diploidalne wykazywały wysoki poziom partenokarpji, zarówno w pokoleniu T_1 jak też T_2 . Jednocześnie nie różniły się od roślin kontrolnych innymi cechami morfologicznymi, chociaż miały nieco mniejsze i bardziej wydłużone owoce na skutek braku nasion. Ich zdolność do tworzenia nasion była zróżnicowana, zawsze niższa od kontroli (do 50%), nawet po krzyżowaniu linii z kontrolą (F1). W fazie kultury *in vitro* zaobserwowaliśmy wydłużenie czasu oraz pojawienie się wielu nietypowych zarodków i pędów. W efekcie czas potrzebny do regeneracji roślin wydłużył się o ok. 30% w stosunku do innych konstrukcji w tej samej odmianie. W wyniku analizy segregacyjnej dwóch diploidalnych linii wykazano jednogenowy charakter dziedziczenia. Istotną różnicą w stosunku do transformacji innymi konstrukcjami był fakt, że w tym eksperymencie regeneracja roślin z kalusa była znacznie utrudniona, a czas potrzebny do otrzymania roślin gotowych do wysadzenia w szklarni był o 30% dłuższy. Prawdopodobnie było to przynajmniej w części niezamierzoną ekspresją transgeny, a w efekcie i zwiększoną produkcją auksyn we wczesnej fazie regeneracji.

7. Ulepszanie wybranych cech użytkowych pomidora

Opracowana przez nas metodyka transformacji pomidora jest modyfikacją metody Frary i Earle (33) i pozwala uzyskiwać rośliny transgenicznie z efektywnością średnio od 2 do 6% oszacowaną jako udział eksplantatów liścieniowych, z których uzyskuje się transgeniczne rośliny T_0 . Średnio dla 50-60% uzyskanych roślin T_0 możliwe jest wyprowadzenie homozygotycznych linii transgenicznych z pojedynczym miejscem integracji transgeny (Czarny i Bartoszewski, dane nie publikowane). Wyższą efektywność transformacji pomidora uzyskiwano stosując szczepy *A. tumefaciens* o umiarkowanej wirulencji takie jak GV3101 czy też LBA4404 (34).

Podjęto próbę poprawy walorów smakowych owoców pomidora przez wprowadzenie do genomu pomidora konstrukcji z genem kodującym białko słodkości taumatynę. Konstrukcję tę wprowadzono do trzech genotypów pomidora m.in. do linii *nor* charakteryzującej się silnie opóźnionym dojrzewaniem owoców. Linie z tą mutacją są wykorzystywane w hodowli mieszańcowej pomidora gdyż pozwalają na uzyskiwanie odmian z owocami o przedłużonej trwałości. Dwie z uzyskanych linii wykazywały ekspresję taumatyny w owocach, a ocena sensoryczna tkanki perykarpu wykazała charakterystyczny posmak (35).

Jedną z ważnych chorób wirusowych pomidora jest brązowa plamistość liści. Chorobę tę wywołuje tospowirus TSWV. W celu uzyskania odporności na tę chorobę wykorzystano konstrukcję genową z genem kodującym nukleoproteinę N bułgarskiego izolatu wirusa TSWV (36). Do transformacji wykorzystano dwie polskie linie hodowlane i odmianę 'Potentat'. Uzyskano transgeniczne rośliny T_0 pochodzące z 12. niezależnych zdarzeń transformacyjnych, z których 7 roślin wytworzyło nasiona. Spośród tych roślin uzyskano 4 transgeniczne linie, które akumulowały nukleoproteinę N na stosunkowo niskim poziomie i wykazywały pewien poziom odporności na polski izolat TSWV (37).

8. Wykorzystanie transformacji genetycznej w analizie funkcjonalnej genów

Transformacja genetyczna jest ważnym narzędziem w analizie funkcjonalnej genów. Wykorzystujemy ją zarówno u ogórka (38) oraz pomidora (39, dane nie publikowane). W ostatnich latach podjęliśmy próbę uzyskania serii transgenicznych linii pomidora pozwalających na szczegółową analizę funkcjonalną kilku genów, ulegających podwyższonej ekspresji po zainfekowaniu korzeni pomidora przez mątwika ziemniaczanego *Globodera rostochiensis* Wolf. (40). Badania takie mogą się przyczynić do opracowania nowych metod walki z tymi pasożytami (41). Wśród wytypowanych do szczegółowej analizy funkcjonalnej genów były m.in. geny kodujące przypuszczalnie syntazę flawonolu (FLS) oraz reduktazę dihydroflawonolu (DFR). Skonstruowano dla tych genów serię kaset ekspresyjnych pozwalających na:

dekspresję, 2) ukierunkowane wyciszenie genów oparte na zjawisku interferencji RNA oraz 3) monitorowanie aktywności promotorów (konstrukcje składające się z promotora badanego genu połączonego z sekwencją genu reporterowego *uidA*). Do transformacji wykorzystano odmianę 'Moneymaker' podatną na *G. rostochiensis*. W wyniku przeprowadzenia serii inokulacji z wykorzystaniem tych konstrukcji uzyskano zestawy transgeniczných roślin T_0 , a następnie transgeniczných linii (pokolenie T_2), które są obecnie przedmiotem szczegółowej analizy (Czarny i wsp., dane nie publikowane; Dąbrowska i wsp., dane nie publikowane).

9. Transformacja genetyczna papryki

Od mniej więcej dekady prowadzone są w naszej katedrze także doświadczenia nad opracowaniem metodyki otrzymywania transgenicznej papryki (*Capsicum annuum* L.). Papryka okazała się bardzo trudnym obiektem do transformacji (42). Wskazują na to wyniki uzyskiwane przez nasz zespół oraz dane innych autorów. Trudno jest zregenerować prawidłowe rośliny z eksplantatów pochodzących z młodych siewek, szczególnie po inkubacji z *A. tumefaciens* czy *A. rhizogenes* i kulturze na pożywkach z czynnikiem selekcyjnym. Pojedyncze transgeniczne rośliny często zamierają zarówno *in vitro* jak i *ex vitro*. W ostatnich latach uzyskaliśmy pojedyncze rośliny transgeniczne papryki w wyniku regeneracji z kalusa indukowanego z eksplantatów liściennych.

10. Podsumowanie

KGHiBR dysponuje wydajną metodyką transformacji dwóch ważnych gatunków warzyw, pomidora i ogórka. Metody te są wykorzystywane do badania funkcji genów oraz otrzymywania linii transgeniczných z określonymi modyfikacjami. W ostatnich latach uzyskaliśmy linie transgeniczne ogórka i pomidora z wprowadzonymi konstrukcjami zawierającymi m.in. geny: taumatyny, dehydryny (GT-DHN24), monoksygenazy IAA (Def19-iaaM), białka zielonej fluorescencji (GFP) i białka N wirusa TSWV. Niektóre z tych linii wykazywały zmienione ważne cechy użytkowe. Na potrzeby analizy funkcjonalnej uzyskaliśmy szereg transgeniczných linii wykazujących nadekspresję, wyciszenie oraz posiadających wprowadzone konstrukcje promotorowe. Zestawy takich linii otrzymaliśmy m.in. dla genów kodujących przypuszczalnie syntazę flawonolu (FLS), reduktazę dihydroflawonolu (DFR) i kilku innych. Zakończyliśmy także kompleksowe badania nad oceną sensoryczną i efektami niezamierzonymi linii transgeniczných ogórka wytwarzających taumatynę. Podjęte zostały prace, których celem jest opracowanie metodyki transformacji papryki.

Badania finansowane częściowo z projektów: N302 003 32/0746, PZB-MNiSW-2/3/2006/3.

Literatura

1. Płader W., Yukawa Y., Sugiura M., Malepszy S., (2007), *Cell Mol. Biol. Lett.*, 12, 584-594.
2. Niemirowicz-Szczytt K., (2002), Instrukcja wdrożeniowa, Opracowanie wykonane w ramach projektu „Indukowanie haploidów i otrzymywanie linii DH z wybranych mieszańców ogórka” finansowanego przez Agencję Własności Rolnej Skarbu Państwa, 1-16.
3. Raś M., Gałęcka T., Korzeniewska A., Niemirowicz-Szczytt K., (2007), *Naturalna i indukowana zmienność w genetycznym doskonaleniu roślin ogrodniczych*, red. Nowaczyk P., 105-110, Wydawnictwo Uczelniane Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy, Bydgoszcz.
4. Niemirowicz-Szczytt K., Faris N. M., Rucińska M., Nikolova V., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 311-314.
5. Nikolova V., Niemirowicz-Szczytt K., (1996), *Acta Soc. Bot. Pol.*, 65, 311-317.
6. Faris N. M., Rakoczy-Trojanowska M., Malepszy S., Niemirowicz-Szczytt K., (2000), *Food Biotechnology*, Eds. Bielecki S., Tramper J., Polak J., 49-54, Elsevier Science B. V., Amsterdam.
7. Szwacka M., Krzymowska M., Osuch A., Kowalczyk M. E., Malepszy S., (2002), *Acta Physiol. Plant.*, 24, 173-185.
8. Gajc-Wolska J., Szwacka M., Malepszy S., (2005), *Folia Hort.*, 17/2, 23-28.
9. Zawirska-Wojtasiak R., Gośliński M., Szwacka M., Gajc-Wolska J., Mildner-Szkudlarz S., (2009), *J. Food Sci.*, 74, C204-C210.
10. Szwacka M., Krzymowska M., Kowalczyk M. E., Osuch A., (2000), *Food Biotechnology*, Eds. Bielecki S., Tramper J., Polak J., 43-48, Elsevier Science B. V., Amsterdam.
11. Schieberle P., Ofner S., Grosch W., (1999), *J. Food Sci.*, 55, 193-195.
12. Filipecki M., Malepszy S., (2006), *J. Appl. Genet.*, 47, 277-286.
13. Szwacka M., Siedlecka E., Zawirska-Wojtasiak R., Wisniewski Ł., Malepszy S., (2009), *J. Appl. Genet.*, 50, 9-16.
14. Kosieradzka I., Sawosz E., Pastuszevska B., Szwacka M., Malepszy S., Bielecki W., Czubińska K., (2001), *J. Anim. Feed Sci.*, 10, Suppl.2, 7-12.
15. Tagashira N., Plader W., Filipecki M., Yin Z., Wiśniewska A., Gaj P., Szwacka M., Fiehn O., Hoshi Y., Kondo K., Malepszy S., (2005), *Cell Mol. Biol. Lett.*, 10, 697-710.
16. Kielkiewicz M., Gajc-Wolska J., Szwacka M., Malepszy S., (2006), *Postępy w Ochronie Roślin*, 46, 457-463.
17. Chinnusamy V., Jianhua Z., Jian-Kang Z., (2007), *Trends in Plant Sci.*, 12, 444-451.
18. Rorat T., Irzykowski W., Grygorowicz W. J., (1997), *Plant Sci.*, 124, 69-78.
19. Rorat T., Grygorowicz W. J., Berbezy P., Irzykowski W., (1998), *Plant Sci.*, 133, 57-67.
20. Yin Z., Rorat T., Szabala B. M., Ziółkowska A., Malepszy S., (2006), *Plant Sci.*, 170, 1164-1172.
21. Korobczak A., Aksamit A., Łukaszewicz M., Lorenc K., Rorat T., Szopa J., (2005), *Plant Sci.*, 168, 339-348.
22. Rorat T., Szabala B. M., Grygorowicz W. J., Wojtowicz B., Yin Z., Rey P., (2006), *Planta*, 224, 205-221.
23. Głodek M., Bartoszewski G., Yin Z., Rorat T., Niemirowicz-Szczytt K., (2008), *Acta Hort.*, 789, 309-314.
24. Ward B. L., Anderson R. S., Bendich A. J., (1981), *Cell*, 25, 793-803.
25. Havey M. J., (1997), *J. Hered.*, 88, 232-235.
26. Lilly J. W., Bartoszewski G., Malepszy S., Havey M. J., (2001), *Curr. Genet.*, 40, 144-151.
27. Bartoszewski G., Malepszy S., Havey M. J., (2004), *Curr. Genet.*, 45, 45-53.
28. Malepszy S., Burza W., Śmiech M., (1996), *J. Appl. Genet.*, 37, 65-78.
29. Bartoszewski G., Havey M. J., Ziolkowska A., Długosz M., Malepszy S., (2007), *J. Appl. Genet.*, 48, 1-9.
30. Köhler H. R., Zipfel W. R., Webb W. W., Hanson M. R., (1997), *Plant J.*, 11, 613-621.
31. Kowara M., Ziółkowska A., Krysiak M., Bartoszewski G., (2007), II Polski Kongres Genetyki, Warszawa, 18-20 września 2007, książka streszczeń, 94-95.
32. Yin Z., Malinowski R., Ziółkowska A., Sommer H., Płader W., Malepszy S., (2006), *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 11, 279-290.

33. Frary A., Earle E. D., (1996), *Plant Cell Rep.*, 16, 235-240.
34. Fedorowicz O., Bartoszewski G., Stoeva P., Niemirowicz-Szczytt K., (2000), *Acta Physiol. Plant.*, 20, 277-303.
35. Bartoszewski G., Niedziela A., Szwacka M., Niemirowicz-Szczytt K., (2003), *Plant Breed.*, 122, 347-351.
36. Stoeva P., Yankulova M., Nikolaeva V., Bachvarova R., Ivanova L., Maiss E., Adam G., Vulkov V., Gulemerov S., Atanassov A., (1998), *Mol. Breed.*, 4, 155-164.
37. Fedorowicz O., Bartoszewski G., Kaminska M., Stoeva P., Niemirowicz-Szczytt K., (2005), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 130, 218-224.
38. Malinowski R., Filipecki M., Tagashira N., Wisniewska A., Gaj P., Płader W., Malepszy S., (2004), *Physiol. Plant.*, 120, 678-685.
39. Bartoszewski G., Mujer C. V., Niemirowicz-Szczytt K., Smigocki A. C., (2002), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 127, 535-539.
40. Świącicka M., Filipecki M., Lont D., van Vliet J., Qin L., Goverse A., Bakker J., Helder J., (2009), *Mol. Plant Path.*, 10, 487-500.
41. Dąbrowska J., Filipecki M., (2010), *Biotechnologia*, 3 (90), 173-190.
42. Delis M., Gałązka J., Żurawska M., Bartoszewski G., Niemirowicz-Szczytt K., (2007), *Progress in Research on Capsicum & Eggplant*, Ed. Niemirowicz-Szczytt K., 355-364, Warsaw University of Life Sciences Press, Warsaw, Poland.